

Title	Dictyostelium discoideum のcAMP 走化性応答に関与する分子の同定
Author(s)	黒岩, 麟平
Citation	平成30年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書
Issue Date	2019-04
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/71934
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

平成 3 0 年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書					
ふりがな 氏 名	くろいわ りんぺい 黒岩 麟平	学部 学科	理学部 生物科学科	学年	2 年
ふりがな 共 同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教 員 氏名	上田昌宏	所属	生命機能研究科		
研究課題名	<i>Dictyostelium discoideum</i> の cAMP 走化性応答に関与する分子の同定				
研究成果の概要	研究目的, 研究計画, 研究方法, 研究経過, 研究成果等について記述すること. 必要に応じて用紙を追加してもよい. (先行する研究を引用する場合は, 「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い, 盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること.)				

1. 研究目的

細胞性粘菌では cAMP 刺激に応答して、GPCR に属する cAMP 受容体が、三量体 G タンパク質 ($G\alpha 2\beta\gamma$) を解離、活性化して、その下流にシグナルを伝達する.¹ このシグナル伝達系において G タンパク質に結合する分子で同定された分子は、いずれも細胞質中に存在する G タンパク質の調節因子であり、細胞膜上で G タンパク質のシグナルを受け取る下流分子は未だ同定されていない. 走化性における勾配認識では拡散速度の小さいイフェクター分子が重要な機能を果たしていると考えられており、拡散速度の小さい細胞膜上で相互作用する分子の同定は重要な研究課題となっている.

本研究は、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の走化性に関する分子ネットワークを解明する一歩として、G タンパク質の $G\alpha 2$ サブユニットに注目し、細胞膜上で結合するタンパク質分子を生化学的に探索した.

2. 研究計画

本研究では、細胞性粘菌の cAMP 走化性応答に関与していると知られている三量体 G タンパク質の $G\alpha 2$ サブユニットに特異的に結合する細胞膜上の分子の生化学的な同定を目指した. そのために、主に次の 3 点を研究項目として設定した.

[研究項目 1] 免疫沈降法による目的タンパク質のプルダウン

[研究項目 2] 質量分析を用いた分子同定

[研究項目 3] Knock out 変異体を用いた候補遺伝子の選別と目的遺伝子の決定

3. 研究方法

[研究項目 1] 免疫沈降法による目的タンパク質のプルダウン

免疫沈降法(Immunoprecipitation, 以下 IP)とは、抗体-抗原の特異的結合を利用して抗原を分離する手法である. 本研究項目では、この系における抗原である $G\alpha 2$ -GFP-FLAG に対して、抗 Flag-Tag 抗体と抗 GFP 抗体を用いた. $G\alpha 2$ -GFP-FLAG に特異的に相互作用する目的タンパク質をプルダウンすることが目的である.(共免疫沈降法)

以下に、ここで示す結果を得た実験系での手法を示す. 以下で述べる3種類の界面活性剤としてはNP-40, TritonX-100, CHAPSを、3つの塩濃度としては44mM, 150mM, 500mM(CHAPSでは44mMのかわりに77mM)を使用した.

1. 粘菌細胞を、1 時間の飢餓状態、4 時間の cAMP パルス($\sim 60\text{nM}$ /回)下に置き発生させたのち、30 分のカフェイン処理(終濃度 5mM)により自発的な cAMP 分泌を停止させた.
2. 粘菌細胞に cAMP 刺激を与え、1 分後に細胞膜を破壊したのち、細胞膜画分を作成した.
3. 細胞膜画分から細胞膜抽出液を作成し、抗 FLAG-Tag 抗体を利用し、 $G\alpha 2$ -GFP-FLAG とそれに特異的に結合するタンパク質をプルダウンした. この時、3 種類の界面活性剤と 3 つの塩濃度の条件下で抽出とプルダウンを行うことで、多様なタンパク質間相互作用に対応した実験系を構築した.
4. 3 をエリューションしたのち、抗 GFP 抗体を利用して、 $G\alpha 2$ -GFP-FLAG と目的タンパク質をプルダウン、エリューションした. ここでも、3 と同じ溶液条件を使用した.

た。

5. SDS-PAGE と銀染色法を利用して、プルダウンしたタンパク質を分離、検出した。
6. AX2 株と $G\alpha 2$ 株の銀染色バンドパターンを比較し、 $G\alpha 2$ 株に特異的なものを目的タンパク質の候補とした。抗 FLAG-Tag 抗体を使って western blotting を行い、 $G\alpha 2$ -GFP-FLAG 由来のバンドを判断した。

4. 研究の経過

[研究項目 1] 免疫沈降法による目的タンパク質のプルダウン

2017年2月-2017年3月にかけて、whole cell extract(WCE)を用いて、FLAG-Tagに対してIP、銀染色を行った。この実験系では、非特異的なタンパク質のバンドが多く、解析が困難で、膜上に存在するタンパクであることが不確かであった。

2017年3月-2018年8月にかけて、細胞膜画分を用いてFLAG-Tagに対してIP、銀染色を行なった。cAMP刺激のアッセイのために、cAMP刺激前後のサンプルの細胞質画分に対して、抗リン酸化抗体を使ったwestern blottingを行い、cAMP刺激のアッセイを行った。cAMP刺激によりリン酸化される分子群が明らかになっている。

2018年8月-2018年11月にかけて、二段階IPにより非特異的なタンパク質の検出を減らすために、細胞膜画分を用いて、FLAG-Tagと GFPに対して、二段階IPを行った。今回示す結果は、この実験系から得られた。

[研究項目 2] 質量分析を用いた分子同定

[研究項目 3] Knock out 変異体を用いた候補遺伝子の選別と目的遺伝子の決定

現在、質量分析を行っており、その結果より候補遺伝子を決定し、研究項目3を行う。

5. 研究結果

$G\alpha 2$ サブユニットに特異的に結合する目的タンパク質の候補を 11 個検出した。以下に、銀染色したゲルの画像(Fig.1 右)と FLAG-Tag を基質とした western blotting の結果(Fig.1 左)、銀染色の各レーンの densitogram(Fig.2)を示す。この結果は、界面活性剤 TritonX-100、塩濃度 500mM の溶液条件の実験から得た。図中の緑丸は $G\alpha 2$ 株($G\alpha 2$ -GFP-FLAG 導入株)に特異的で、目的タンパク質の候補のバンドである。

Fig.3 に同じ溶液条件での、cAMP 刺激前後のサンプルを使用した銀染色画像を示す。

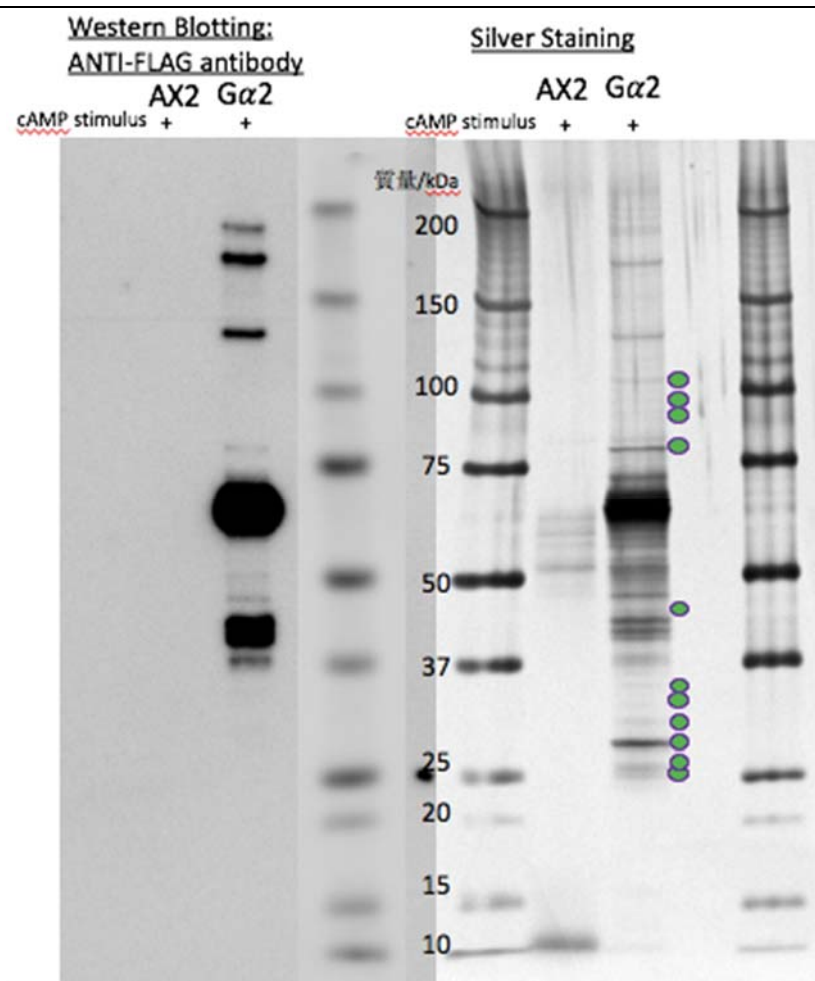


Fig. 1 銀染色と western blotting の結果

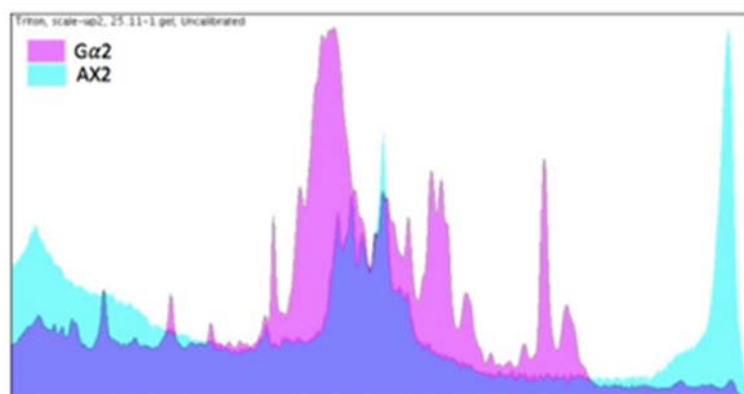


Fig. 2 銀染色の Densitogram

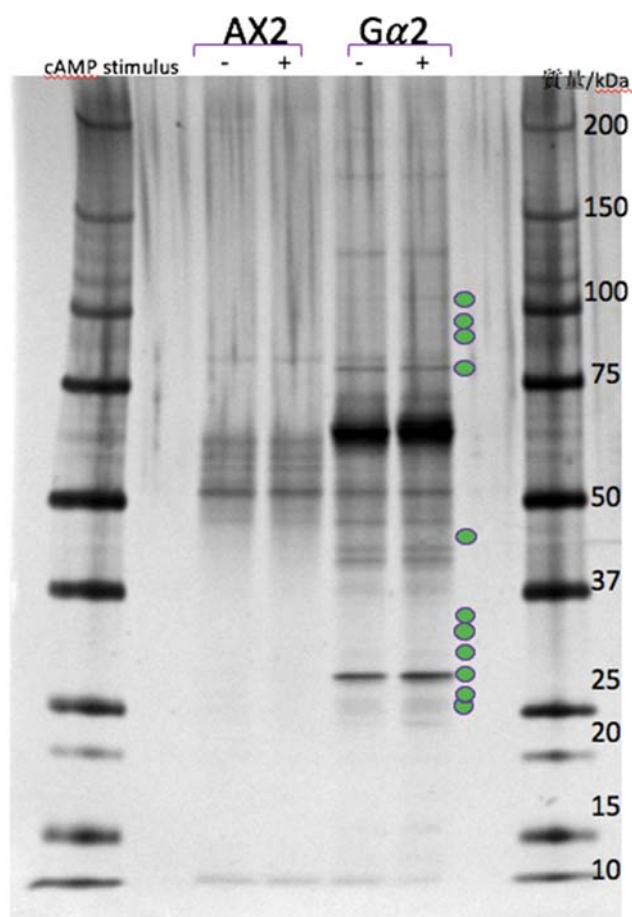


Fig.3 cAMP 刺激前後/銀染色の結果

6. 研究成果

Fig.1 に示すように、候補タンパク質として 11 種を見出した. FLAG-Tag に対する western blotting により, ~190, ~170, ~130, ~75, ~50, 40 付近(kDa)のタンパク質は FLAG-GFP-G α 2 の二量体, 三量体や, 部分的に破壊されたものである可能性が高いと判断できるので候補タンパク質には含めていない.

Fig.3 で示したように、今回見出した候補タンパク質は cAMP 刺激前後の両方で G α 2 と相互作用しているようである. 目的タンパク質は細胞膜上で cAMP シグナルを仲介するが、これは cAMP 刺激のあるときだけ、G α 2 と相互作用することを意味していない. cAMP 刺激時のみシグナルを伝達する機構の可能性があるので、今回見出した候補タンパク質は有効である.

あるいは、目的タンパク質が cAMP 刺激時のみに G α 2 と相互作用するとしても、実験操作に含まれる cAMP パルスによって形成された複合体が一部解離していないのを検出した可能性もある. 実際、cAMP 刺激の有無で濃さが異なるバンド(~100kDa)もあるので、バンドの濃さの差の再現性を今後確認することは意義がある. 1 サンプル中の細胞数は同じにコントロールしてあるので、バンドの濃さの差には生理学的な意味があると期待できる.

今回は、二段階 IP を行ったため、G α 2 サブユニットと目的タンパク質の複合体が cAMP 刺激により形成されてから、時間が経っている. G α 2 と目的タンパク質複合体の安定性は低いと考えられているので、実験の条件を再度検討することで、新規のタンパク質を検出できる可能性がある. 具体的には、IP と FLAG-Tag elution の時間と、wash の回数/時間

をできるだけ小さくしてかつ、容認できる効率が得られる実験条件を再設定することで、新たな成果を期待できる。

目的タンパク質の候補として、11 のタンパク質種を検出した。現在、質量分析を行っており、結果が入手でき次第、*Dictyostelium discoideum* のゲノム情報を利用して、それらのアミノ酸/塩基配列と遺伝子が決定できる。

細胞性粘菌とヒト免疫系の細胞では走化性に働く分子で共通のものが知られており、実際細胞性粘菌で発見された分子が後にヒト細胞でも機能していると確認された例が多数ある。G タンパク質は多くの生物種で普遍的に存在するので、今後得られる研究成果は、多くの生物種における共通した仕組みの解明にも繋がると考えられる。³

7. 参考文献

- 1) Swaney, K. F., Huang, C., & Devreotes, P. N. “Eukaryotic Chemotaxis: A Network of Signaling Pathways Controls Motility, Directional Sensing, and Polarity.” *Annu. Rev. Biophys.* 2010.39:265-289,
- 2) 同上
- 3) 細胞性粘菌学会, “細胞性粘菌とは”. Retrieved December 2, 2018, from <http://dicty.jp/dicty>